

CHROM. 6905

Note

À propos de la photographie en couleurs de chromatographies sur couches minces en lumière de Wood

J. F. GONNET

Service de Phytochimie et Phytophysiologie, Département de Biologie Végétale, Université Claude-Bernard, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69521 Villeurbanne (France)

(Reçu le 1 juin 1973, manuscrit modifié reçu le 25 juin 1973)

L'illustration de conférences ou articles par des documents photographiques est devenue de nos jours une pratique extrêmement courante en raison, sans doute, du caractère particulièrement véridique de ce mode de présentation et de la facilité avec laquelle elle peut être obtenue. La réalisation d'un document en couleur de bonne qualité ne pose aucun problème lorsque les substances séparées après chromatographie présentent une coloration en lumière visible, coloration propre (pigments animaux ou végétaux par exemple) ou coloration obtenue après pulvérisation d'un réactif spécifique. Il existe cependant de nombreux composés dont la présence sur le chromatogramme ne peut être décelée que par la lumière visible qu'ils émettent lorsqu'ils sont excités par des radiations ultra-violettes, ou dont cette fluorescence constitue l'une des caractéristiques qu'il est intéressant d'enregistrer à l'aide du procédé photographique. Dans ce cas, l'obtention d'un cliché correct s'avère beaucoup plus difficile qu'en lumière visible en raison de la sensibilité de la pellicule aux rayons ultra-violettes qui se traduit, après le développement, par l'apparition d'une dominante bleue intense masquant tout ou partie de la fluorescence des composés présents.

Divers articles ont été précédemment publiés, traitant de la photographie en lumière ultra-violette: certains ne concernent que la photographie en noir et blanc¹, d'autres, consacrés à la photographie en couleurs restent relativement imprécis^{2,3}. L'utilisation d'ensembles spécialement étudiés pour ce type de prises de vues (Uvanalys de W. Bälz et Sohn, Repro-Star de Camag, UVIS de Desaga) permet de réaliser très facilement d'excellents clichés, cependant leur coût assez élevé ne les met pas à la portée des laboratoires au sein desquels la photo en UV est surtout occasionnelle.

Nous détaillons donc ici une technique qui nous permet d'obtenir d'excellents clichés à l'aide d'un matériel photographique qui devrait faire partie de l'équipement de tout laboratoire de recherches moderne, auquel s'ajoutent quelques accessoires peu coûteux, propres à ce type de prise de vue.

MATÉRIEL UTILISÉ

Choix de l'appareil de prise de vue

Dans la pratique, n'importe quel appareil à visée réflexe et objectif interchangeable peut convenir. Seul ce type d'appareil permet en effet un cadrage et une

mise au point précis dans les conditions de ce type de photographie; il est possible d'autre part, en interposant des tubes-allonges entre l'objectif et le boîtier, d'enregistrer tout ou partie d'un chromatogramme. Parmi ce type d'appareils, notre préférence va à ceux dont le système de visée est amovible: le classique prisme de visée est substitué par une loupe à fort grossissement associée à un dépoli quadrillé permettant un cadrage facile et une mise au point extrêmement précise.

L'utilisation de l'objectif standard (1.8 ou 1.4/50 mm en 35 mm) de ces appareils est parfaitement recommandable pour ce travail; dans certains cas, sur lesquels nous reviendrons ultérieurement, l'emploi d'une optique de focale plus grande peut s'avérer cependant préférable.

Le plus souvent, le tirage maximal de la bague des distances de ces objectifs étant insuffisant pour obtenir une image assez grande du chromatogramme (*a fortiori* d'une partie de celui-ci), des tubes-allonges sont interposés entre le boîtier et l'objectif afin d'obtenir le rapport de reproduction souhaité. Les objectifs de type "Macro" suppriment la manipulation des tubes, leur mise au point étant continue entre l'infini et quelques centimètres; en contrepartie, leur ouverture relative est souvent moindre que celle des optiques standard, ce qui peut poser quelques problèmes pour la mise au point.

Enfin, l'appareil est fixé (si possible par l'intermédiaire d'un chariot de mise au point) sur un trépied robuste équipé d'une tête cinéma orientable en tous sens, dont l'emploi facilite grandement la composition de l'image.

Pour notre part, nous utilisons le matériel suivant qui nous donne toute satisfaction:

— En format 35 mm: Appareil Miranda Mirax Laborec II, équipé du viseur VF 5 et d'un dépoli quadrillé, d'un objectif Super-Takumar 1.8/55 mm et d'un jeu de tubes-allonges Asahi-Pentax.

En format 6 × 7 cm: Appareil Asahi-Pentax 6 × 7, équipé du viseur à capuchon rigide, de l'objectif Super-Takumar 2.4/105 mm et d'un jeu de tubes-allonges.

Ces appareils sont montés sur trépied Gitzo No. 4 équipé d'une tête rationnelle No. 4, par l'intermédiaire d'un chariot de mise au point Praktica.

Les filtres

L'un des problèmes que pose ce type de photographie consiste à éliminer, dans la plus large mesure, les radiations ultra-violettes excitatrices, source de la dominante bleue associée souvent à une perte de contraste, afin de n'enregistrer que la fluorescence des composés. La solution consiste à employer un ou plusieurs filtres dont le choix n'est pas toujours facile en raison même de la diversité de ceux-ci. Les filtres "anti-UV" classiques (correspondant à des variantes du Wratten 1A) utilisés en photo d'amateur ne conviennent pas, leur absorption dans l'ultra-violet étant nettement insuffisante*. On utilisera donc un filtre plus "sélectif", tel que la gélatine Kodak Wratten No. 2A (ne transmet les radiations lumineuses qu'à partir de 410 nm*). De plus, nous superposons à ce dernier une gélatine Wratten No. 85C qui a pour effet, dans le cas précis, d'améliorer très nettement le rendu des couleurs. L'emploi combiné de ces deux filtres nous permet d'obtenir des images de la fluorescence de nos pigments flavoniques (jaune, verte, orangée, violette) et chlorophylliens (rouge) se détachant parfaitement sur un fond de teinte bleu-nuit.

* Voir la brochure "Filtres Kodak pour l'usage Scientifique et Technique".

Ces filtres sont placés sur une monture professionnelle No. 2 (Kodak), un filtre étant fixé, à l'aide d'une bande adhésive, sur chacune des faces de celle-ci (il n'est pas recommandé en effet de placer les deux filtres en contact à l'intérieur de la monture sans risquer la formation d'anneaux de Newton, préjudiciables à la netteté de l'image). La monture est placée dans le porte-filtre professionnel Kodak No. 2 fixé sur le barillet avant de l'objectif à l'aide des trois vis de serrage.

L'éclairage

N'importe quelle lampe émettant des radiations de 365 nm de longueur d'onde peut être utilisée. Il convient, cependant, de choisir un modèle d'une puissance suffisante de manière à éviter des durées d'exposition prohibitives. Nous utilisons pour nos prises de vues deux lampes Mazda MAW 125 alimentées chacune par un transformateur MA 125 MA 22 G. Ces lampes présentent à nos yeux de nombreux avantages par rapport aux lampes équipées de tubes à lumière froide :

Outre celui d'un coût excessivement bas (une lampe et son alimentation sont vendus actuellement aux environs de 80 F.F.), elles sont extrêmement puissantes, ce qui permet d'utiliser des temps d'exposition relativement brefs.

Elles émettent une lumière pratiquement monochromatique 365–366 nm, ce qui ne nécessite l'emploi d'aucun filtre sur les lampes.

Elles sont à culot vissant E-27 et peuvent donc équiper les porte-lampes utilisés en photographie traditionnelle. Elles dégagent cependant une quantité de chaleur importante et ne peuvent être rallumées qu'au bout de quelques minutes après avoir été éteintes ; ces deux petits inconvénients ne sont nullement gênants pour le but dans lequel elles sont utilisées ici.

Les films

Le type de document à réaliser dicte le choix du film, inversible pour l'obtention d'un positif à projeter ou négatif donnant un positif sur support opaque pour l'illustration. Dans les deux cas, un film équilibré pour la lumière du jour (6100°K) doit être utilisé.

Tous les films négatifs couleur du commerce peuvent donner de bons résultats. Signalons tout de même les caractéristiques particulières du film Agfa-Gevaert Scientia Color, qui peuvent se révéler très intéressantes pour résoudre quelques problèmes particuliers. Le gamma de ce film (qui présente de plus une définition exceptionnelle allié à un grain très fin) atteint après traitement selon les normes du fabricant une valeur de 3. Il permet donc d'obtenir, à partir de chromatogrammes très peu contrastés des négatifs donnant au tirage d'excellentes copies positives. Mais sa sensibilité spectrale étant équilibrée pour la lumière artificielle (3200°K), le filtre Wratten 85C doit être remplacé par un filtre 85B. L'emploi de ce film reste cependant limité aux cas particuliers, en raison principalement de sa très faible sensibilité (4 DIN) exigeant des temps de pose extrêmement longs (parfois plus de 30 min).

L'obtention de diapositives, en dehors du tirage sur film positif couleur à partir de négatifs, est possible à l'aide de n'importe quel film inversible, de préférence de rapidité moyenne. L'utilisation des films vendus développement non compris nous semble cependant préférable, car ils présentent l'avantage de pouvoir être traités par l'utilisateur, immédiatement après la prise de vues. En cas d'erreur, celle-ci peut être recommencée sur l'heure alors que l'on dispose encore des chromatogrammes, ce qui

s'avère difficile, voire impossible, lorsqu'il faut attendre le retour du film d'un laboratoire. Nous utilisons l'Ektachrome-X de Kodak traité dans les bains du procédé E-4, qui nous permet de visionner nos diapositives moins de 2 h après la fin de la prise de vues. Au moment où nous écrivons ces lignes, nous apprenons la mise en circulation d'un nouveau film inversible lumière du jour, le Kodak Photomicrography Color Film SO 456, qui présente un pouvoir séparateur et un contraste très élevés. Cette pellicule, qui se traite comme les films Ektachrome normaux, a les mêmes domaines d'utilisation que le Scientia Color d'Agfa-Gevaert et présente en outre les avantages d'une rapidité beaucoup plus grande (13 DIN) et de donner directement une diapositive.

PRISE DE VUES

Celle-ci doit s'effectuer dans un local dans lequel il est possible d'obtenir une obscurité totale et dont les murs, de couleur sombre, soient aussi peu réfléchissants que possible. Pour ce dernier point, l'emploi de papier à dessin noir mat (utilisé par les dessinateurs et maquettistes) donne d'excellents résultats. La même remarque s'applique évidemment en ce qui concerne les vêtements de l'opérateur: la blouse blanche doit être proscrite et l'on revêtera une tenue de couleur sombre. Enfin, le port de lunettes opaques aux rayons ultra-violet est vivement conseillé si l'on veut éviter les risques d'une conjonctivite.

Disposition des sources lumineuses

Le type d'éclairage, dont dépend la disposition des lampes, est subordonné au type de support du chromatogramme. L'expérience nous a montré que dans le cas de supports en verre (plaques "artisanales" coulées au laboratoire), les meilleurs résultats sont obtenus en lumière transmise; par contre, avec les plaques commerciales prêtes à l'emploi dont le support est opaque (aluminium par exemple), la seule méthode possible est d'éclairer par réflexion. Dans les deux cas, le chromatogramme est placé par l'intermédiaire d'un étau qui le maintient sur un petit élévateur de laboratoire qui permet de le positionner par rapport aux sources lumineuses ou à l'appareil de prise de vues.

En lumière transmise, les deux lampes sont placées à 20 cm en arrière de la plaque de manière à éclairer celle-ci de manière uniforme.

En lumière réfléchie, les sources sont placées entre la plaque et l'appareil de prise de vues, à une distance suffisante pour avoir un éclairage uniforme et pour que les lampes soient hors du champ couvert par l'objectif (en général 30 cm). En raison de la chaleur dégagée par les lampes, nous préférons dans ce cas, utiliser un objectif de focale plus longue (105 mm en 24 × 36 mm) ce qui permet d'éloigner l'appareil et les filtres de cette source de chaleur, tout en gardant le même rapport de reproduction sur la pellicule.

Enfin, quel que soit le mode d'éclairage adopté, si les lampes ne sont pas montées dans un réflecteur, on prendra toute précaution pour éviter l'arrivée de rayons ultra-violet directement sur les filtres (ou l'objectif); en effet, le filtre 85C présente une légère fluorescence qui, dans certains cas, peut nuire à la qualité de l'image. Dans la pratique, un simple carton noir percé d'un orifice de taille convenable est amplement suffisant.

Prise de vues proprement dite

Une fois le chromatogramme placé et éclairé de manière uniforme la mise au

point est faite sur le dépoli, l'objectif étant ouvert à sa plus grande ouverture et coiffé des deux filtres (on vérifiera que le plan de la plaque et celui du film soient bien parallèles). L'objectif est ensuite diaphragmé à la valeur choisie pour la prise de vues (toutes les nôtres sont effectuées à f. 4,5). L'une des difficultés de celle-ci réside dans l'évaluation du temps de pose. Sa durée exacte ne peut être déterminée qu'après des essais dont toutes les conditions auront été enregistrées. Pour un rapport de reproduction donné d'une plaque éclairée par des sources lumineuses placées à une distance connue, on prend une série de vues à différents temps de pose après avoir noté l'exposition donnée par un posemètre (Lunasix dont l'élément de mesure est coiffé d'un filtre Wratten 2A) maintenu à une distance également connue de la plaque. Après développement, le temps de pose correspondant à une exposition correcte est noté et sert de base pour l'évaluation de celui des vues ultérieures. Cette valeur est en effet corrigée pour chaque cliché en fonction des variations d'éclairement au niveau des chromatogrammes (consécutives à de nombreuses causes: épaisseur de la plaque de verre, de la couche d'adsorbant, etc.) mesurée à l'aide du posemètre placée à la même distance que pour la réalisation de l'essai. Naturellement on n'omettra pas de tenir compte du coefficient de prolongation du temps de pose consécutif à l'emploi des tubes-allonges.

Les appareils classiques équipés de cellules placées derrière l'objectif ne facilitent guère les mesures les éclaircissements à mesurer se situant bien souvent en dessous des possibilités du posemètre incorporé. Il en va tout autrement avec les derniers-nés de la technique photographique que constituent les appareils automatiques à obturateur électronique (Asahi-Pentax Electro Spotmatic, Minolta XM) qui peuvent mesurer des temps de pose jusqu'à trente secondes; avec de tels appareils, après étalonnage préalable, il suffit de presser le déclencheur pour avoir la certitude d'obtenir un cliché correct. Cependant, ces appareils ne figurent pas encore dans l'équipement de tous les laboratoires.

Dans les conditions que nous avons énumérées, les temps de pose que nous employons varient de 3 à 9 sec à f. 4.5 pour un film de 64 ASA.

Dans certains cas, des corrections nécessitées par des variations dans l'intensité de la fluorescence doivent être apportées à la valeur obtenue après mesure au posemètre. Certains composés en effet, présentent une fluorescence très intense (par exemple les acides-phénols) alors que d'autres se manifestent beaucoup plus discrètement en lumière de Wood (flavones, de fluorescence brun-violette). Dans le premier cas, il sera prudent de diviser le temps de pose lu par un coefficient pouvant varier de 1.5 à 2 et d'effectuer la même correction, mais en sens contraire dans le second.

CONCLUSION

Cette méthode, devenue d'une pratique presque quotidienne dans notre laboratoire, nous donne d'excellents résultats et nous a permis de constituer une photothèque de tous nos chromatogrammes, relatifs à l'analyse flavonique de nombreux échantillons végétaux, à laquelle nous pouvons nous référer constamment sans autre manipulation que celle des clichés et d'une visionneuse.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. Abelson, *Nature (London)*, 188 (1960) 850.
- 2 K. Randerath, *Chromatographie sur Couches Minces*, Gauthiers-Villars, Paris, 1964, p. 81.
- 3 E. A. Braun (Rédacteur), *Black light creates Fascinating Fluorescence*, 1968, p. 19.